

苏云金杆菌 B. tIII 菌株生物学特性初探

林志伟¹, 孙冬梅², 宋金柱², 杨凤军¹

(1. 黑龙江八一农垦大学植科院植保系, 密山 158308; 2. 哈尔滨工业大学生命科学系, 哈尔滨 150001)

摘要: 利用不同培养基从不同生态区取样分离苏云金杆菌, 采用不同培养成分对不同苏云金杆菌菌株生长情况进行测试。结果表明: 分离的 B. tIII 菌株产芽孢能力较强; 培养成分变化影响到菌体数量; 最适蛋白胨与蔗糖含量为 1%; 适量添加 CaCO₃ (0.1%) 有利于芽孢的形成。

关键词: 分离; 苏云金杆菌; 生物学特性

中图分类号: S 482.39 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2003)04-0011-03

Study on the Bio-characteristics of *Bacillus thuringiensis* III

LIN Zhi-wei¹, SUN Dong-mei², SONG Jin-zhu², YANG Feng-jun¹

(1. Department of Plant Protection, Heilongjiang August First Reclamation University, Mishan, 158308; 2. Department of Biotechnology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract: Adopting different cultural medium isolated *Bacillus thuringiensis* from different soils, and identified the growth ability of isolated strains. The result showed: B. tIII strain had the str-

* 收稿日期: 2003-04-03

第一作者简介: 林志伟(1970-), 男, 黑龙江省七台河市人, 讲师, 从事植保教学与科研工作。

表 4 不同播期各品种产量性状比较

| 品种 | 播期 | 株高 (cm) | 荚高 (cm) | 分枝 | 节数 | 单株荚数 | 单株粒重 (g) | 百粒重 (g) | 产量 (kg/hm ²) | 减产 (%) |
|-------|----|------------|------------|-----|------|------|-------------|------------|-----------------------------|-----------|
| 黑农 33 | A | 105.0 | 15.4 | 0.6 | 20.0 | 26.8 | 9.6 | 18.0 | 2042.9 | 52.68 |
| | B | 113.0 | 19.6 | 0.1 | 20.0 | 21.7 | 8.9 | 17.8 | 1076.2 | |
| 黑农 37 | A | 74.8 | 12.8 | 0.8 | 15.4 | 43.8 | 18.4 | 17.8 | 2340.0 | 47.20 |
| | B | 87.0 | 15.4 | 0.4 | 18.0 | 35.0 | 14.3 | 17.5 | 1104.4 | |
| 黑农 39 | A | 106.0 | 20.8 | 1.4 | 18.0 | 42.6 | 14.6 | 18.0 | 2300.0 | 43.48 |
| | B | 113.0 | 23.6 | 0.2 | 19.0 | 37.8 | 10.7 | 17.8 | 1000.0 | |
| 黑农 40 | A | 104.0 | 23.7 | 1.7 | 20.6 | 42.4 | 16.6 | 20.2 | 2333.3 | 43.03 |
| | B | 108.0 | 26.0 | 0.7 | 21.0 | 30.4 | 12.3 | 18.9 | 1004.0 | |
| 黑农 41 | A | 86.6 | 16.9 | 0.4 | 18.8 | 48.7 | 19.5 | 18.0 | 2366.7 | 56.00 |
| | B | 92.0 | 22.3 | 0.1 | 19.0 | 40.9 | 16.3 | 18.0 | 1328.6 | |

3 结论

3.1 晚播缩短了大豆的营养生长阶段, 而对生殖生长阶段的影响较小。

3.2 晚播大豆具有较高株高, 并与正常播期有着相同(或接近)的叶面积和叶面积指数, 但各生育阶段的光合速率偏低, 且呼吸消耗较大, 因此导致茎、叶、花荚的干物质积累量减少, 且比例失调, 虽在 R₅ 期单株可溶性糖及总糖积累量高于正常播期, 但运往花荚的量少, 最终导致产量的降低。

3.3 适时播种是大豆在适应区内获得高产量的基

本条件, 晚播将造成产量损失, 因品种生育期的差异而不同, 同期晚播生育期越长的品种产量损失越大。

参考文献:

- [1] 张桂茹. 播期对大豆干物质积累分配及产量的影响[J]. 黑龙江农业科学, 1998, (3): 34-35.
- [2] 陈洁敏, 赵九洲, 杨方人, 等. 播期对大豆开花及产量的影响[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 225-230.
- [3] 王继安, 王雪峰, 姬长举, 等. 不同播期对极早熟大豆产量及农艺性状的影响[J]. 大豆科学, 2001, 20(2): 149-152.
- [4] 满为群, 杜维广, 印文汇, 等. 大豆北种南移分期播种对生育期结构及产量的影响[J]. 大豆通报, 2002, (2): 6.

stronger ability of producing endospore. The changed medium could affect the growth of *B. t*III strain. The optimum content of peptone and sucrose was one percent. Adding zero point one percent CaCO_3 could be advantage to the formation of endospore.

Key words: isolation; *bacillus thuringiensis*; bio—characteristic

苏云金杆菌是一种生防菌,对150多种昆虫有不同程度的致病作用^[1]。可利用伴孢晶体与芽孢达到杀虫目的。相关资料表明,不同培养成分对菌体生长有一定的影响,导致芽孢形成量与伴孢晶体数量的变化,最终影响到杀虫效果^[2]。本试验针对从土壤中分离到的产芽孢能力较强 *B. t*III 菌株进行了初步研究,以利于该菌株能更好的在生物防治中应用。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离

1.1.1 培养基 ①基础培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1.0%,琼脂 2.0%,pH 7.0;②醋酸钠(AC)培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1.0%,醋酸钠 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3.4%,pH 7.0;③NaCl 培养基:牛肉膏 0.5%,蛋白胨 1.0%,NaCl 分别取 2.0%,4.0%,6.0%,pH 7.0。

1.1.2 土样 选择不同生态环境,取约距地表 3~5 cm 处土样,包括玉米田土(I)、山下草地土(II)、松林土(III)、山上土(IV)及花坛土(V)和街边土(VI)。

1.1.3 方法 各取 1 g 从不同土壤中采集的土样,分别加入盛有 50 mL AC 培养基和不同浓度 NaCl 培养基的 300 mL 三角瓶中,30℃振荡培养 4 h 后,置 80℃热处理 20 min,用无菌吸管各吸 1 mL,用涂布器分别均匀涂布到含有基础培养基的琼脂平板上,每个土样重复 3 次,30℃培养 36 h,选取表面扁平、具乳突状、颜色为灰白色、乳白色或淡黄色等典型 *B. t* 菌落,镜检菌体形态,凡有伴孢晶体者定为 *Bt* 菌落,最后统计镜检平皿总菌落数,*B. t* 菌落数,计算 *B. t* 菌株分离比率(*B. t* 菌落数除以镜检平皿总菌落数得 *B. t* 百分率)。

1.2 培养特性

1.2.1 不同菌株芽孢形成能力测定 ①菌株:*B. t*I、*B. t*II 为实验室保留;*B. t*III 为土壤中分离;②培养基:基本细菌培养基;③方法:采用 1.2.1②中的细菌培养基振荡培养不同的苏云金杆菌,培养条件为 28℃,150 rpm,每 2 h 取一环菌液涂片染色,于显微镜油镜下观察,每个片子观察 6 个视野,记载有无芽孢形成,观察至 48 h。芽孢比率=观察到的芽孢

个数/(芽孢+菌体)总数。

1.2.2 不同培养成分对苏云金杆菌生长的影响

①菌株: *B. t*III;②培养基:a 牛肉膏 8 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g,水 1000 mL;b 蛋白胨 10 g,蔗糖 10 g,酵母膏 2 g, KH_2PO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g,水 1 000 mL;c 豆饼粉 10 g,葡萄糖 5 g, KH_2PO_4 0.7 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, CaCO_3 0.5 g,水 1 000 mL;d 牛肉膏 3 g,蛋白胨 5 g,NaCl 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g,水 1 000 mL。③

方法:利用 1.2.2②中的不同培养基,30℃振荡培养 28 h 后,将菌液稀释,选择 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 三个梯度进行倒皿,1 d 后记载菌落个数,每处理重复 3 次。

1.2.3 同一基本培养基,同一培养条件 加入不同含量的蛋白胨与蔗糖及 CaCO_3 后对菌体生长与芽孢形成的影响。①菌株: *B. t*III;②基本培养基:酵母膏 2 g, KH_2PO_4 0.7 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g,水 1 000 mL。变换培养基中蛋白胨与蔗糖含量,分别为:(a)蛋白胨 10 g,蔗糖 10 g;(b)蛋白胨 20 g,蔗糖 10 g;(c)蛋白胨 40 g,蔗糖 10 g;(d)蛋白胨 40 g,蔗糖 30 g;(e)蛋白胨 20 g,蔗糖 30 g;(f)蛋白胨 10 g,蔗糖 30 g;(g)蛋白胨 10 g,蔗糖 10 g, CaCO_3 1 g。③方法:利用 1.2.3②中的不同培养基,30℃振荡培养 28 h 后,取一环菌液涂片染色,于显微镜油镜下观察,每个片子观察六个视野,记载芽孢形成数量,并将菌液稀释,选择 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 三个梯度进行倒皿,1 d 后记载菌落个数,每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果

采用 AC 培养液摇瓶培养法 48 h,在镜检的 346 个菌落中获得 2 个 *Bt* 菌株,分离率为 0.6%;采用 2.0% 的 NaCl 培养液振荡培养 48 h 后,324 个菌落中获得 2 个 *Bt* 菌株,分离率达 0.7%;采用 4% NaCl 培养液振荡培养 48 h 后,210 个菌落中获得 3 个 *Bt* 菌株,分离率达 1.4%;采用 6% NaCl 培养液振荡培养 48 h 后,170 个菌落中获得 1 个 *Bt* 菌株,分离率 0.6%(见表 1)。由分离结果可以看出,用 4% NaCl 分离土壤中的苏云金芽孢杆菌可获得理想

表 1 4 种不同方法对 B. t 的选择性分离效果

| 项目 | AC 培养液 | | | 2.0%NaCl 培养液 | | | 4.0%NaCl 培养液 | | | 6.0%NaCl 培养液 | | |
|-----|--------|---|-----|--------------|---|-----|--------------|---|-----|--------------|---|-----|
| | a | b | c | a | b | c | a | b | c | a | b | c |
| I | 80 | 1 | 1.2 | 70 | 1 | 1.4 | 60 | 1 | 0 | 50 | 0 | 0 |
| II | 40 | 0 | 0 | 39 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| III | 20 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 |
| IV | 46 | 1 | 2.2 | 40 | 1 | 2.5 | 20 | 2 | 10 | 30 | 1 | 3.3 |
| V | 70 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| VI | 90 | 0 | 0 | 85 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 |
| 总计 | 346 | 2 | 0.6 | 324 | 2 | 0.7 | 210 | 3 | 1.4 | 170 | 1 | 0.6 |

注:a 为总菌落数;b 为 Bt 菌落数;c 为分离率(%)。

的效果。

2.2 培养特性

2.2.1 不同菌株在同一培养条件下芽孢形成能力测定 B. t.I 菌株 16 h 菌体量明显增多,22 h 芽孢开始形成,36 h 芽孢脱落,芽孢最大比率为 32.3%;B. t.II 菌株类似于 B. t.I 菌株,但 34 h 芽孢脱落,芽孢最大比率为 33.5%;B. t.III 菌株 16 h 菌体量明显增多,18 h 芽孢开始形成,28 h 芽孢脱落,芽孢最大比率为 63.5%(见图)。从图中数据可知,B. t.III 菌株芽孢形成时间较早,且芽孢数量最大,这对其在实

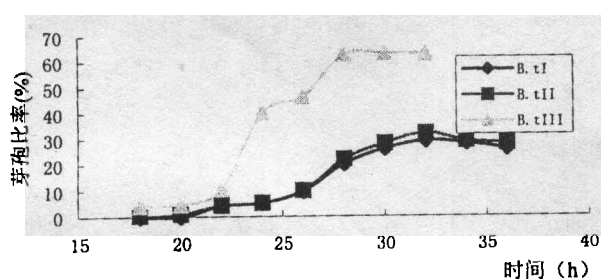


图 不同菌株产芽孢能力

际生产中的应用有力,可使生防菌对外界环境变化有更强的适应能力。

2.2.2 不同培养成分对菌体生长量的影响 不同营养成分对菌体生长影响较大,选择产芽孢能力较强的 B. t.III 菌株测定,结果表明:b 最有利于菌体生长,菌量可达 9.47×10^8 个/mL,a 与 d 之间菌量差别不大,说明该菌株对无机氮利用能力不强,甚至不利用,这与资料报道一致,从 b 与 c 的差别可看出,有机氮源以蛋白胨最有利于菌株生长,同时从 4 种

表 2 不同培养成分变化对菌体生长的影响

| 培养基 | a | b | c | d |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 菌数 | 6.2×10^8 | 9.5×10^8 | 3.0×10^8 | 6.0×10^8 |
| | 6.5×10^8 | 9.7×10^8 | 2.7×10^8 | 5.7×10^8 |
| | 6.0×10^8 | 9.2×10^8 | 2.8×10^8 | 5.8×10^8 |
| 平均 | 6.2×10^8 | 9.5×10^8 | 2.8×10^8 | 5.8×10^8 |

表 3 方差分析

| 培养基 | 菌体个数($\times 10^8$) | 差异显著性 |
|-----|-----------------------|-------|
| b | 9.5 | a |
| d | 6.2 | b |
| a | 5.8 | b |
| c | 2.8 | c |

培养基的培养结果可知:菌体在生长过程中需要一定量的无机营养与微量元素(见表 2、表 3)。

2.3 不同蛋白胨与蔗糖含量及 CaCO_3 加入对菌体生长与芽孢形成的测定

结果表明:(a)和(g)培养基中菌体量较大,经镜检发现(a)中以营养体为主,(g)中则 90%以上均形成芽孢且以释放。稀释倒皿结果与观察类似。认为:蔗糖与蛋白胨含量为 1%时适宜菌体生长,蔗糖含量大于 30%对菌体生长有抑制作用; CaCO_3 加入可明显刺激菌体中芽孢的形成(见表 4)。

表 4 培养成分变化对菌体生长的影响

| 培养基 | (a) | (b) | (c) | (d) | (e) | (f) | (g) |
|--------------------------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|
| 菌落数($\times 10^8$ 个/mL) | 5.8 | 1.6 | 1.5 | 0.07 | 0.07 | 0.1 | 5.6 |

3 讨论

3.1 蛋白胨与蔗糖含量变化对营养体与芽孢的影响与报道的有一定差别,有待于针对不同菌株进一步测试。

3.2 加入 CaCO_3 可刺激菌体中芽孢的形成,其原因需在以后的研究中进一步深化。

3.3 由于 B. t.III 菌株有较强的产芽孢能力,需对其杀虫效果进一步研究,以便发挥其生防功用。

参考文献:

- [1] 戴莲韵,王学聘. 苏云金杆菌研究进展[M]. 北京:科学出版社,1997.
- [2] 喻子牛. 苏云金杆菌制剂生产与应用[M]. 北京:农业出版社,1993.
- [3] 李阜棣,喻子牛,何绍江. 农业微生物实验技术[M]. 北京:农业出版社,1996.